

# 不同产地川乌炮制前后差异性成分研究

吴丹丹, 刘艳, 郭鹏飞, 匡海学, 杨炳友\*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 建立川乌及制川乌的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并结合化学计量学方法和主成分含量测定, 比较 3 个不同产地川乌炮制前后的差异成分, 为不同产地川乌炮制前后质量控制提供科学依据。该文采用 HPLC 法, Waters SunFire C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 乙腈-冰醋酸(0.2%)水溶液(使用三乙胺调节 pH 值为 6.20)为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL min<sup>-1</sup>, 检测波长 235 nm。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)计算相似度, 并结合聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘分析(PLS-DA)、正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)及主成分含量测定结果进行综合分析。结果表明: (1) 建立了 3 个产地 15 批川乌炮制前后的 HPLC 指纹图谱, 分别标定了 25 个和 14 个共有峰, 并通过对照品指出 6 个共有峰, 分别为苯甲酰新乌头原碱(峰 16)、苯甲酰乌头原碱(峰 17)、苯甲酰次乌头原碱(峰 18)、新乌头碱(峰 21)、次乌头碱(峰 22)、乌头碱(峰 23)。(2) 化学计量学方法分析显示, 川乌炮制前后的 30 批样品被明显分为 2 类, 15 批川乌被分为 3 类, 15 批制川乌被分为 3 类, 新乌头碱、次乌头碱等 6 个成分可能是不同产地川乌炮制前后的潜在差异成分。(3) 炮制前后主成分含量测定结果均有不同程度的变化, 四川江油所产川乌炮制前后部分成分含量明显高于另外两个产地所产川乌。该研究所建立的指纹图谱精密度、重复性、稳定性均较好, 结合化学计量学分析方法和主成分含量测定分析, 可为不同产地川乌炮制前后质量控制提供参考。

**关键词:** 川乌, HPLC, 指纹图谱, 化学计量学方法, 含量测定, 质量控制

中图分类号: Q946

文献标识码: A

## Different components between Aconiti Radix and its processed product from different regions

WU Dandan, LIU Yan, GUO Pengfei, KUANG Haixue, YANG Bingyou\*

(Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao (Heilongjiang University of Chinese Medicine),

Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** To evaluate the differences from 3 different regions by chemometrics and principal component content determinations, we established HPLC fingerprints of Aconiti Radix and its processed product, which provided a scientific basis for the quality control of Aconiti Radix from different regions before and after processing. The HPLC method was established on a Waters SunFire C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm). Acetonitrile-glacial acetic acid (0.2%) solution (triethylamine adjusted pH to 6.20) was adopted as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL min<sup>-1</sup>, and with the detection wavelength of 235 nm. The fingerprints were analyzed by the software of "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine". The discriminant analysis of hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were employed, and combined with chemometrics and the determination results of principal components. The results were as follows: (1) HPLC fingerprints of 15 batches of Aconiti Radix and its processed product from 3 areas were established, 25 and 14 common fingerprint peaks were calibrated in 15 batches

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFC1707103); 黑龙江省“头雁”团队 [Supported by National Key Research and Development Project (2018YFC1707103); Heilongjiang Touyan Innovation Team Program]。

**作者简介:** 吴丹丹 (1990-), 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制, (E-mail) dlwudd@163.com。

\* **通信作者:** 杨炳友, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制, (E-mail) ybywater@163.com。

of raw and processed, 6 peaks were identified by the mixed reference product. They were benzoylmesaconitine (peak 16), benzoylaconitine (peak 17), benzoylhypaconitine (peak 18), mesaconitine (peak 21), hypaconitine (peak 22), aconitine (peak 23). (2) Chemometrics showed that 30 batches of samples were clustered into two categories, 15 batches of raw products were classified into 3 classes, 15 batches of processed products were classified into 3 classes. Six components containing mesaconitine and hypaconitine may be the markers of the quality difference between them. (3) The content determination results of principal components changed in varying degrees before and after processing, and the determination results of some principal components in Sichuan Jiangyou producing area before and after processing were significantly higher than those in the other two producing areas. The fingerprint method which established in the study is accurate, repeatable, and reliable. Furthermore, combined with chemical pattern recognition, it could be used for the quality control of Aconiti Radix and its processed product from different regions.

**Key words:** Aconiti Radix, HPLC, fingerprints, chemometric, content determination, quality control

川乌味辛、苦，性热，有大毒，一般炮制后用(唐梅等，2017；中华人民共和国药典，2020；叶协滔等，2020)，主产于四川、陕西、云南等地，其道地产区为四川江油，多以栽培品为主。由于各地种植程度不等及栽培环境不同，对川乌质量产生了极大的影响(林华和邓广海，2011；赵军宁等，2020)。现代医学研究表明，川乌具有抗炎(Yu et al., 2019)、镇痛(Wang et al., 2015; Nyirimigabo et al., 2015)、抗肿瘤(Wang & Chen, 2010)等作用，同时也对心脏(Liu et al., 2019; Li et al., 2020)和中枢(Qin et al., 2012; Liu et al., 2017)等有毒性作用。川乌中所含的双酯型生物碱既是其有效成分同时又是其毒性成分(Qin et al., 2012)，炮制后可将其水解为单酯型生物碱，从而降低毒性(Liu et al., 2017)。但由于炮制不当或错误使用等问题，常导致中毒事件发生，因此严格控制川乌炮制前后的质量尤为重要(Shaw, 2010)。

目前，中药材质量控制的方法以含量测定为主(Shaw, 2010; Luo et al., 2016)，但由于中药成分复杂且不明确，仅以单个或几个成分的含量进行质量控制，不能全面地反应药材的质量。因此能够实现多成分、多指标质量控制的指纹图谱技术开始受到广泛的关注(Zhu et al., 2013; 赵翡翠等，2014; Zheng et al., 2014; 马丽娟等，2016; Luo et al., 2018; Miao et al., 2019)。然而对川乌的 HPLC 指纹图谱研究仅为不同产地的川乌差异比较(熊江等，2005；林华和邓广海，2011；司欣鑫，2019；魏惠珍等，2020；杨磊，2020)和炮制前后差异比较(于永军等，2009；黄志芳等，2011；邓广海，2011；秦语欣，2016)，共有峰标定均较少，对差异性成分的研究不明确且没有将 HPLC 指纹图谱与多元统计分析和含量测定的方法相结合，综合考察产地因素对川乌炮制前后差异成分的影响。因此，本实验选取川乌 3 个主要产地炮制前后的川乌样品，建立高效液相色谱(HPLC)指纹图谱并结合化学计量学方法及主成分含量测定，筛选 3 个不同产地川乌炮制前后的潜在差异成分，为川乌与制川乌质量控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

乙腈和冰醋酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯；实验用水为屈臣氏蒸馏水；新乌头碱(以下简称 Mes，批号 CHB180311)、乌头碱(以下简称 Aco，批号 CHB180408)、次乌头碱(以下简称 Hyp，批号 CHB180524)、苯甲酰新乌头原碱(以下简称 BMA，批号 CHB180310)、苯甲酰乌头原碱(以下简称 BAC，批号 CHB180309)、苯甲酰次乌头原碱(以下简称 BHA，批号 CHB180307)均购自成都克洛玛生物科技有限公司，纯度均 $\geq 98\%$ 。川乌药材采自于陕西省汉中市城固县三合镇龙王庙村 2 组、四川省江油市太平镇普照村 2 组、四川省绵阳市平武代坝村 3 个产地各 5 批，共 15 批川乌样品，已被樊锐锋副教授鉴定(黑龙江中医药大学药学院)均为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaelii*)的干燥母根，保存于黑龙江中医药大学中药化学实验室。制川乌的炮制方法采用 2020 版《中国药典》方法蒸制(中华人民共和国药典，2020)。

高效液相色谱仪(e2695，美国 Waters 公司)；色谱柱为 Waters SunFire C<sub>18</sub>(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)；旋转蒸发仪(OSB-2100，日本 EYELA 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 色谱条件

Waters SunFire C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.2%冰醋酸水溶液(B, 三乙胺调 pH 值 6.20), 梯度洗脱(0~8 min, 5%~13%A; 8~13 min, 13%~21%A; 13~25 min, 21%~26%A; 25~50 min, 26%~26%A; 50~53 min, 26%~29%A; 53~58 min, 29%~37%A; 58~63 min, 37%~40%A; 63~73 min, 40%~80%A); 体积流量 1.0 mL min<sup>-1</sup>; 检测波长 235 nm; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

#### 1.2.2 对照品溶液的制备

分别取对照品适量, 用 0.01% 盐酸甲醇溶液定容, 配制成含 Mes 0.06 mg mL<sup>-1</sup>、Aco 0.06 mg mL<sup>-1</sup>、Hyp 0.05 mg mL<sup>-1</sup>、BMA 0.05 mg mL<sup>-1</sup>、BAC 0.06 mg mL<sup>-1</sup>、BHA 0.06 mg mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 备用。

#### 1.2.3 供试品溶液制备

分别取川乌和制川乌粉末(过三号筛)适量于具塞锥形瓶中, 依次加入氨试液 2.0 mL、异丙醇 25 mL、乙酸乙酯 25 mL, 超声提取 2 次(300 W, 40 kHz, 25 °C以下), 每次 30 min, 静置过夜, 过滤, 合并滤液。减压浓缩(40 °C以下), 0.01% 盐酸甲醇溶液定容至 5.0 mL, 进样前离心, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 备用。

#### 1.2.4 含量测定

取对照品适量, 用 0.01% 盐酸甲醇溶液定容, 配制成含 Mes 3.17 mg mL<sup>-1</sup>、Aco 3.18 mg mL<sup>-1</sup>、Hyp 3.00 mg mL<sup>-1</sup>、BMA 0.61 mg mL<sup>-1</sup>、BAC 0.10 mg mL<sup>-1</sup>、BHA 0.13 mg mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液, 备用。按“1.2.3”项下“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 并按“1.2.1”项下“色谱条件”重复测定 3 次。

#### 1.2.5 方法学考察

##### 1.2.5.1 线性关系考察

取“1.2.2”项下混合对照品储备液, 梯度稀释, 并按“1.2.1”项下“色谱条件”进样检测, 记录峰面积。横坐标(X)为质量浓度、纵坐标(Y)为峰面积, 进行线性回归, 分别得到线性回归方程。

##### 1.2.5.2 精密度考察

取“1.2.2”项下混合对照品储备液, 按“1.2.1”项下“色谱条件”重复测定 5 次, 记录峰面积。

##### 1.2.5.3 稳定性考察

取川乌样品(S1)适量, 按“1.2.3”项下“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 并按“1.2.1”项下“色谱条件”分别于室温在 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 记录峰面积。

##### 1.2.5.4 重复性考察

取川乌样品(S1)5 份, 按“1.2.3”项下“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 并按“1.2.1”项下“色谱条件”进样检测, 记录峰面积。

##### 1.2.5.5 加样回收率考察

取已知含量的川乌样品(S1)适量, 按一定比例(50%、100%、150%)加入混合对照品储备液(Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA), 按“1.2.3”项下“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 并按“1.2.1”项下“色谱条件”重复测定 3 次, 记录各峰面积。

#### 1.2.6 指纹图谱的建立

分别取混合对照品溶液、15 批川乌和 15 批制川乌制备的供试品溶液, 按“1.2.1”项下“色谱条件”进样检测, 记录色谱图。其混合对照品色谱图见图 1。将所得 15 批川乌及 15 批制川乌的图谱导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”中, 设 S1 样品的图谱为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1 min, 选用中位数法, 进行多点校正, 以全谱峰进行峰匹配, 生成对照指纹图谱, 分别得到 15 批川乌与 15 批制川乌样品的指纹图谱及其对照指纹图谱, 见图 2 与图 3。

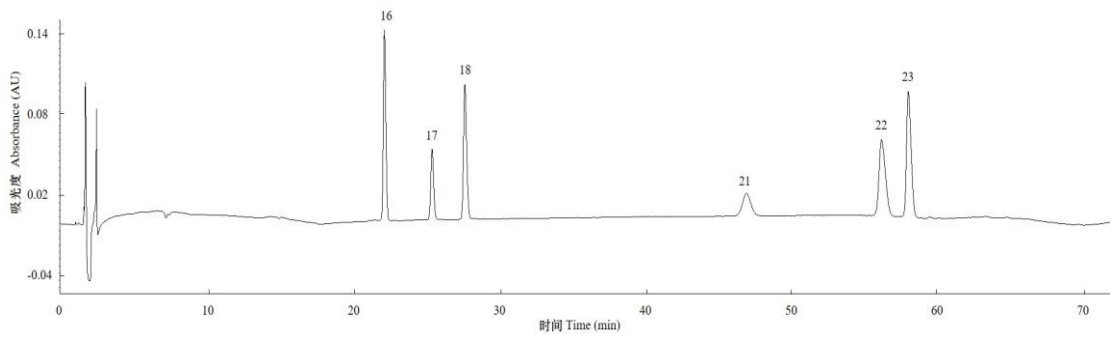


图 1 混合对照品色谱图

Fig.1 Reference chromatogram of mixed standard

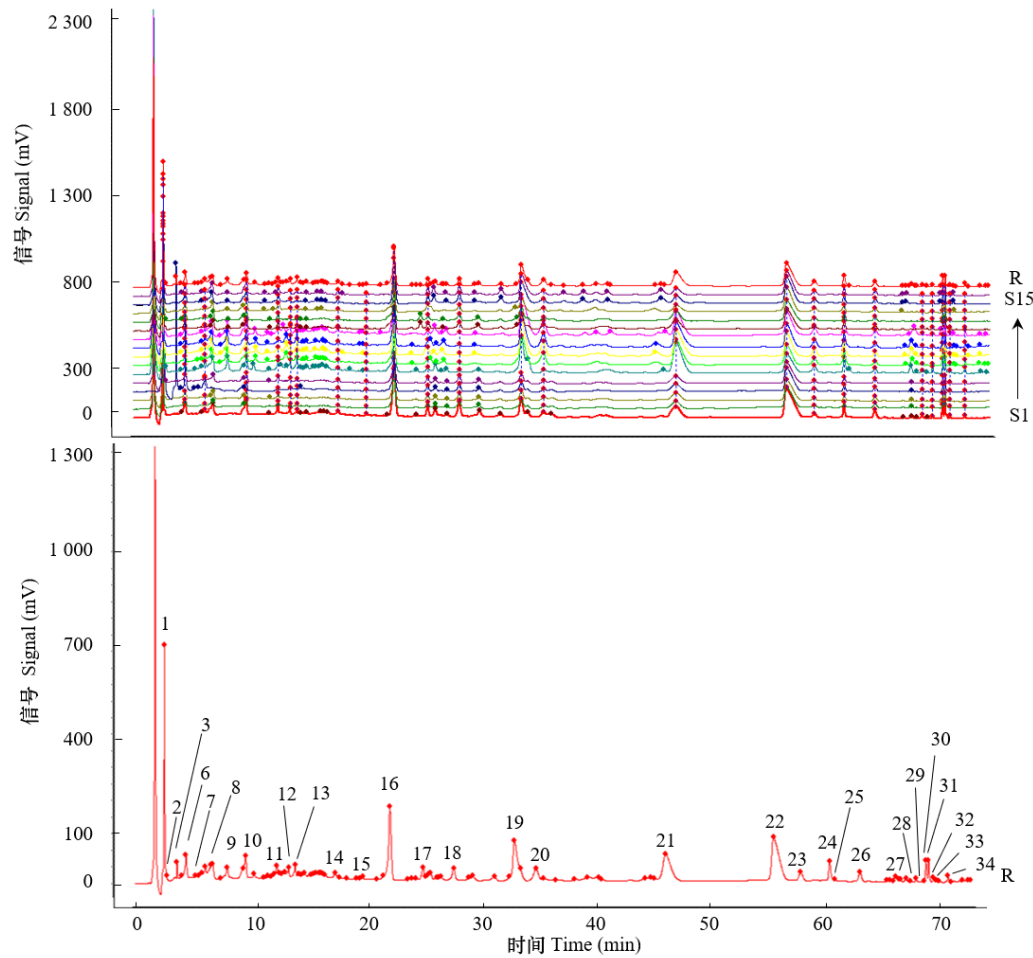


图 2 15 批川乌指纹图谱及对照指纹图谱(R)

Fig.2 Fingerprint for 15 batches of Aconiti Radix and its reference fingerprint(R)

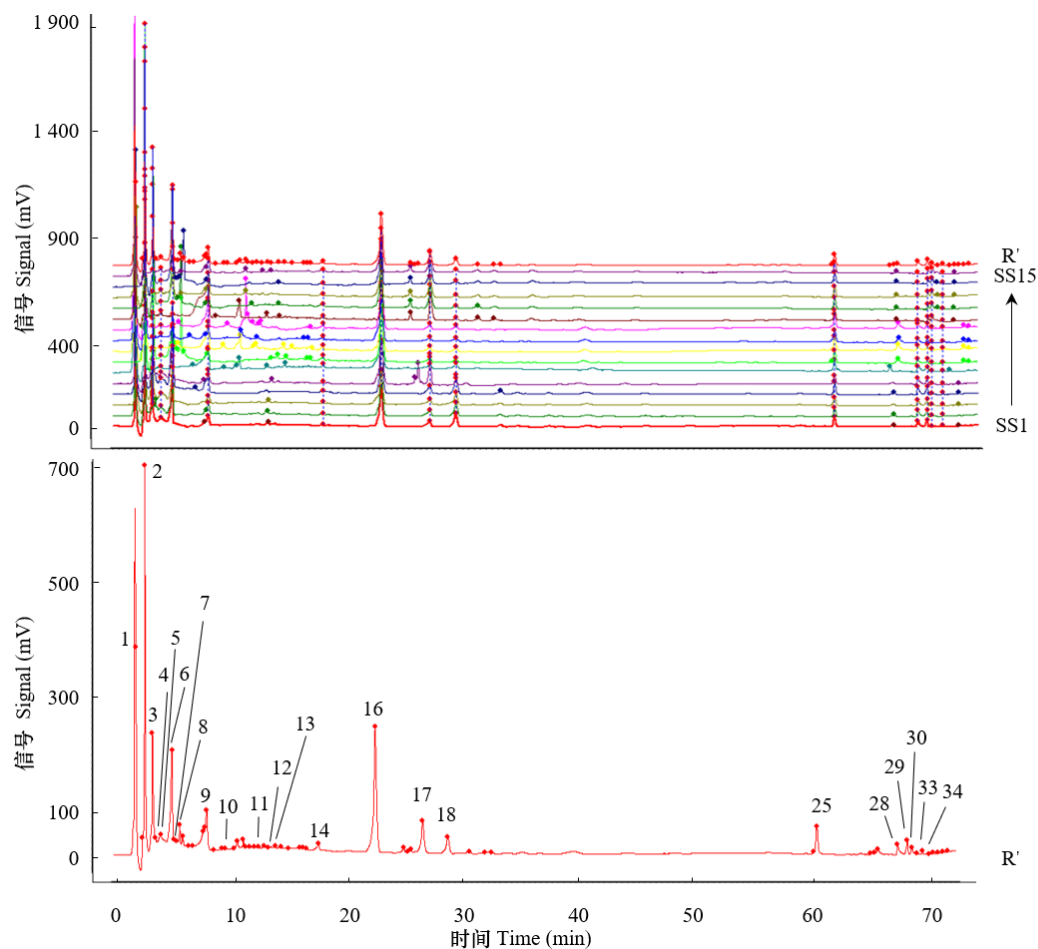


图 3 15 批制川乌指纹图谱及对照指纹图谱(R')

Fig.3 Fingerprint for 15 batches of Aconiti Radix Preparata and its reference fingerprint(R')

## 2 结果与分析

### 2.1 相似度分析

川乌样品 S1~S15 与参照指纹图谱的相似度结果分别为 0.949、0.948、0.951、0.776、0.952、0.902、0.926、0.925、0.923、0.908、0.969、0.970、0.955、0.956、0.955，除样品 S4 与参照图谱的相似度为 0.776，其余样品与参照图谱的相似度均 $\geq 0.902$ ，可知除陕西汉中产地外其余产地川乌相似度较好；制川乌样品 SS1~SS15 与参照指纹图谱的相似度结果分别为 0.812、0.870、0.756、0.738、0.925、0.914、0.913、0.900、0.898、0.862、0.836、0.924、0.903、0.912、0.904，除样品 SS3 和 SS4 与参照图谱的相似度为 0.756、0.738，其余样品与参照图谱的相似度均 $\geq 0.812$ ，可知除陕西汉中产地，另外两个产地相似度均较好，但也存在一定差异。

### 2.2 化学计量法分析

#### 2.2.1 聚类分析 (HCA)

采用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>) 统计学网站对 15 批川乌和 15 批制川乌指纹图谱的 34 个特征峰峰面积进行聚类热图分析。由图 4 可知，30 批样品被明显聚为两类，川乌(S1~S5 为陕西汉中川乌的五个批次，S6~S10 为四川江油川乌的五个批次，S11~S15 为四川绵阳川乌的五个批次)聚为一类，制川乌(SS1~SS5 为陕西汉中制川乌的五个批次，SS6~SS10 为四川江油制川乌的五个批次，SS11~SS15 为四川绵阳制川乌的五个批次)聚为一类。即川乌和制川乌能被明显区分，说明川乌炮制前后化学成分有一定差异，可通过指纹图谱的聚类分析将其分类。根据热图分析可判断制川乌中峰



2、3、5、7、9、16 (BMA)、17 (BAC)、18 (BHA)、25、28、29 代表的化学成分明显高于川乌，川乌中峰 10、11、12、13、15、19、20、21 (Mes)、22 (Hyp)、23 (Aco)、24、26、27、30、31、32、34 代表的化学成分明显高于制川乌，四川江油的川乌中峰 10、11、12、13、19、20、21 (Mes)、23 (Aco)、24、30、34 代表的化学成分明显高于另外两个产地。

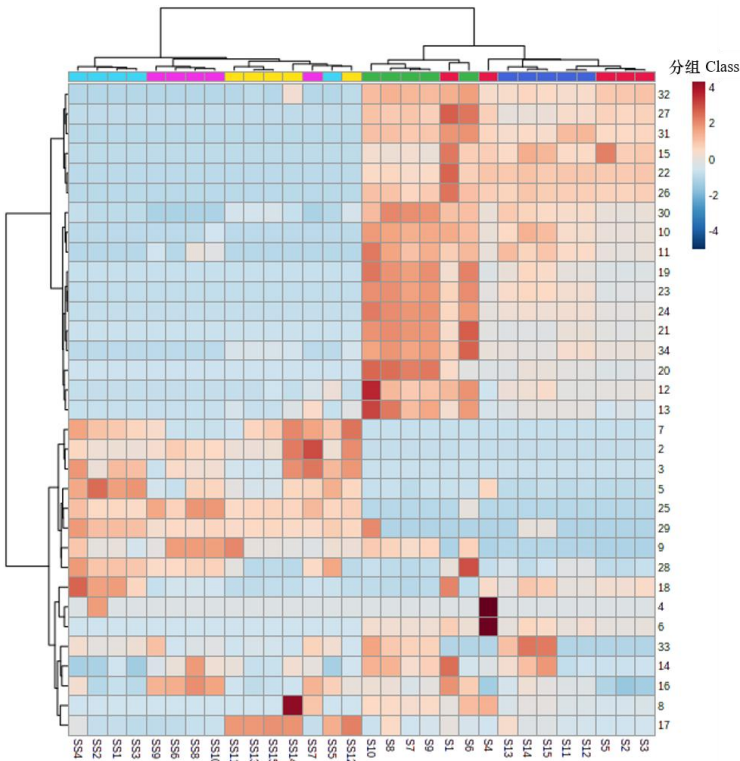


图 4 3 个产地川乌炮制前后聚类热图结果

Fig.4 Results of heatmap clustering of Aconiti Radix and its processed product from three regions

2.2.2 主成分分析 (PCA)

采用 SIMCA 14.1 统计学软件对 15 批川乌和 15 批制川乌指纹图谱的 34 个特征峰峰面积进行主成分分析，得分矩阵图见图 5，模型参数  $R^2X$  值及预测能力参数  $Q^2$  值分别为 0.751、0.541。结果显示 30 批样品可被分为两组，其中川乌(S1~S15)为一组，制川乌(SS1~SS15)为一组，此分组与 HCA 结果基本一致。此外批次 S10 位于得分图范围外，推测这一批样品与其他批质量差异较大。

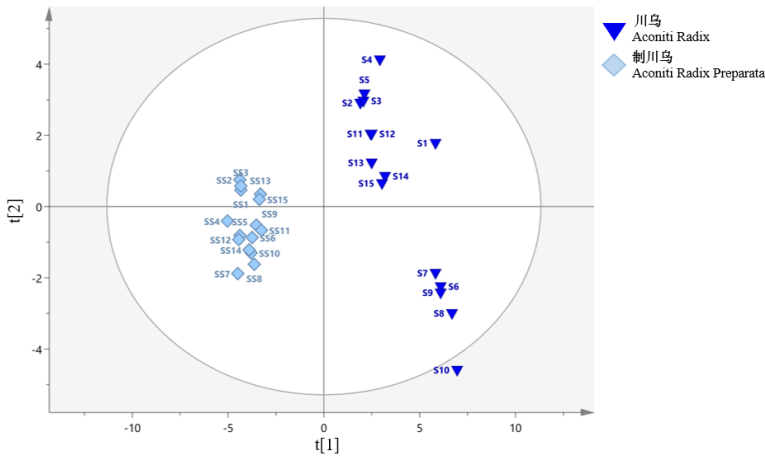


图 5 3 个产地川乌炮制前后主成分得分图

Fig.5 Principal components analysis scores plot of Aconiti Radix and its processed product from three regions

2.2.3 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)

采用 SIMCA 14.1 分析软件, 分别对 15 批川乌和 15 批制川乌指纹图谱的 34 个特征峰峰面积进行 PLS-DA 分析, 得分图见图 6、图 7。模型参数  $R^2X$  值、稳定性参数  $R^2Y$  值及预测能力参数  $Q^2$  值分别为 0.996、0.999、0.977, 说明所建 PLS-DA 模型稳定性良好。结果显示在得分散点图中 3 个产地的川乌明显被分为 3 类, 该分析结果与 HCA 和 PCA 结果基本一致。从 3 个产地 15 批川乌中共提取得到 16 个主成分( $VIP>1.0$ ), 其中峰 32、27、33、16 (BMA)、9、21 (Mes)、11、20、23 (Aco)、34、24、28、19、31、13 和 18 (BHA)的变化对不同产地川乌的区分贡献较大; 同样对 3 个产地 15 批制川乌进行 PLS-DA 分析, 共提取 8 个主成分( $VIP>1.1$ ), 模型参数  $R^2X$  值、 $R^2Y$  值及  $Q^2$  值分别为 0.973、0.999、0.912, 结果显示在得分散点图中 3 个产地的制川乌明显被分为 3 类, 峰 34、30、28、16 (BMA)、17 (BAC)、5、29、18 (BHA)、25、14 的变化对不同产地制川乌的区分贡献较大, 该分析结果与 HCA 和 PCA 结果基本一致。

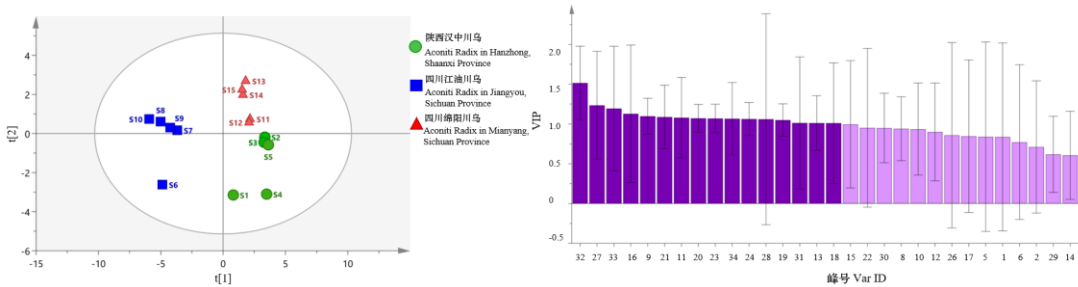


图 6 3 个产地川乌 PLS-DA 得分图及 VIP 分析图

Fig.6 PLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix by PLS-DA from three regions

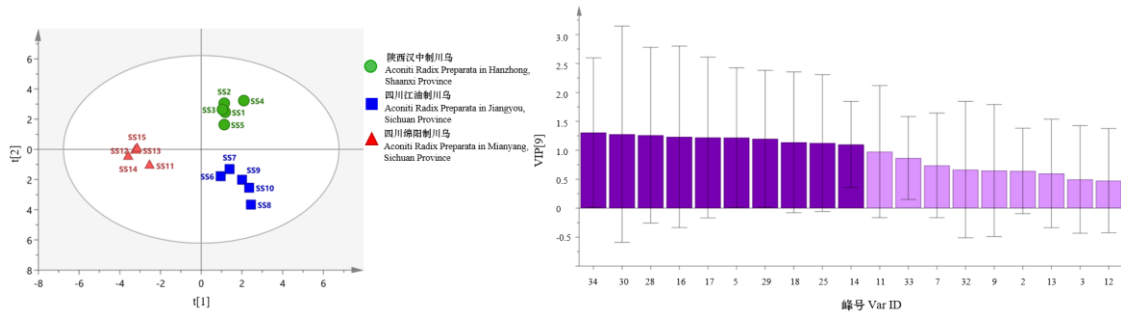


图 7 3 个产地制川乌 PLS-DA 得分图及 VIP 分析图

Fig.7 PLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix Preparata by PLS-DA from three regions

2.2.4 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

采用 SIMCA 14.1 分析软件, 对 15 批川乌和 15 批制川乌指纹图谱的 34 个特征峰峰面积进行 OPLS-DA 分析, 提取得到 8 个主成分( $VIP>1.0$ ), 模型参数  $R^2X$  值、 $R^2Y$  值及  $Q^2$  值分别为 0.721、0.960、0.941, 结果显示在得分散点图中炮制前后的川乌明显被分为 2 类, 峰 22 (Hyp)、2、1、21 (Mes)、19、3、7 和 10 的变化对炮制前后的区分贡献较大, 该分析结果与 HCA 和 PCA 结果基本一致, 结果见图 8。采用置换检验( $n=200$ )对当前模型进行验证, 检验参数  $R^2=(0.0, 0.143)$ ,  $Q^2=(0.0, -0.396)$ , 结果见图 9, 左侧随机排列产生的  $R^2$  及  $Q^2$  的值均小于右侧的原始值, 表明所建立的 OPLS-DA 模型拟合良好, 能够用于川乌与制川乌的判别分析。

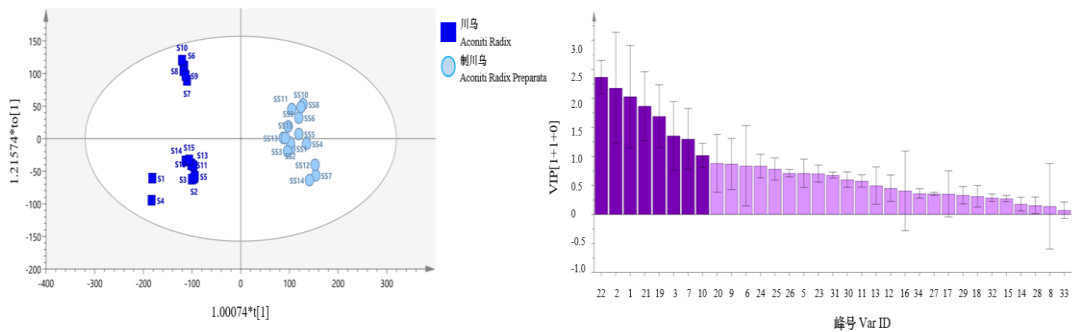


图 8 3 个产地川乌炮制前后 OPLS-DA 得分图及 VIP 分析图  
Fig.8 OPLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix and its processed product from three regions

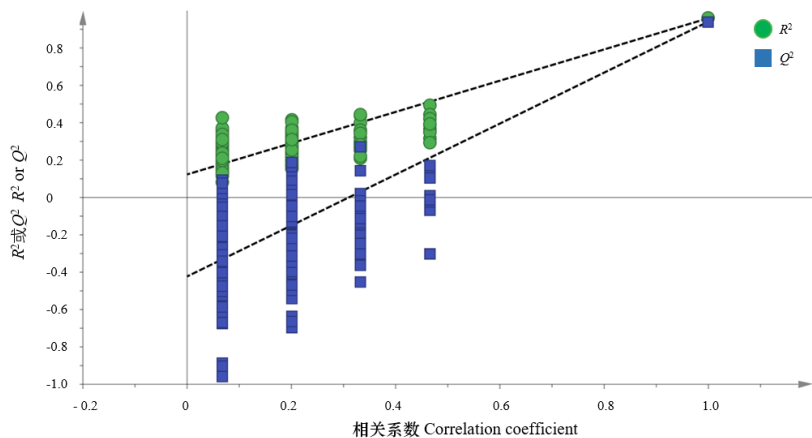


图 9 3 个产地川乌炮制前后 OPLS-DA 模型的置换检验  
Fig.9 OPLS-DA permutation test of Aconiti Radix and its processed product from three regions  
对陕西汉中产地 10 批炮制前后川乌进行 OPLS-DA 分析，共提取得到 9 个主成分 (VIP>1.1)，模型参数  $R^2X$  值、 $R^2Y$  值及  $Q^2$  值分别为 0.991、0.999、0.995，结果显示在得分散点图中炮制前后的川乌明显被分为 2 类，峰 22 (Hyp)、1、2、3、7、21 (Mes)、6、5、19 的变化对陕西汉中产地炮制前后川乌的区分贡献较大，推测次乌头碱可能为陕西汉中产地川乌炮制前后的差异成分，该分析结果与 HCA 和 PCA 结果基本一致，见图 10。

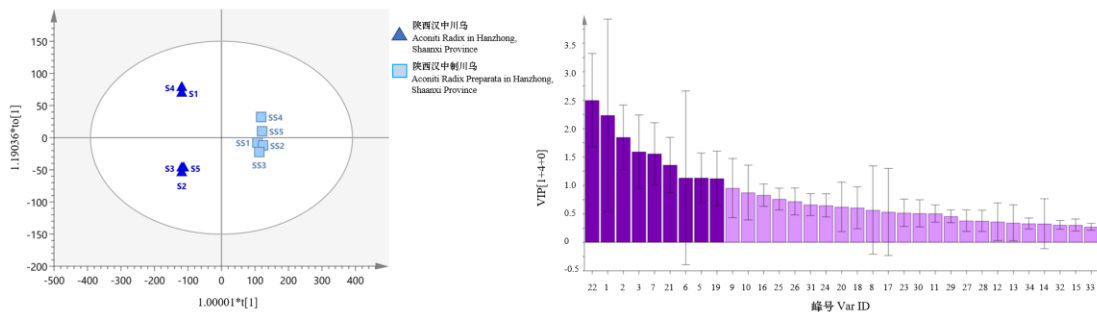


图 10 陕西汉中川乌炮制前后 OPLS-DA 得分图及 VIP 分析图  
Fig.10 OPLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix and its processed product by OPLS-DA in Hanzhong, Shaanxi Province

对四川江油产地 10 批炮制前后川乌进行 OPLS-DA 分析，共提取得到 15 个主成分 (VIP>1.1)，模型参数  $R^2X$  值、 $R^2Y$  值及  $Q^2$  值分别为 0.792、0.998、0.994，结果显示在得分散点图中炮制前后的川乌明显被分为 2 类，峰 23 (Aco)、22 (Hyp)、26、24、32、6、19、21 (Mes)、34、31、10、1、15、30、27 的变化对四川江油产地炮制前后川乌的区分贡献较大，推测乌头碱可能为四川江油产地川乌炮制前后的差异成分，该分析结果与 HCA 和 PCA 结



果基本一致，见图 11。

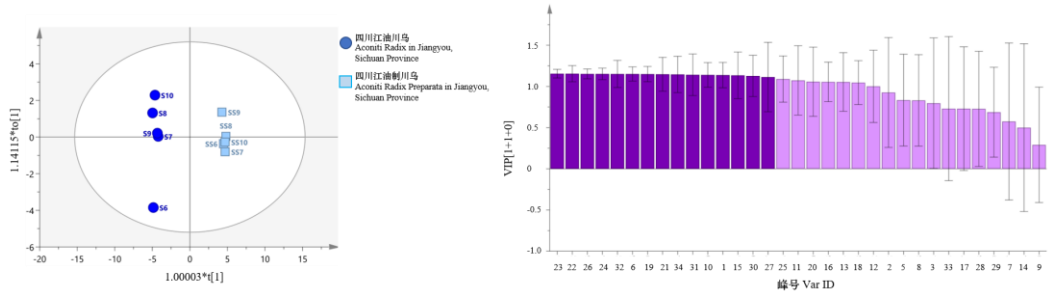


图 11 四川江油川乌炮制前后 OPLS-DA 得分图及 VIP 分析图

Fig.11 OPLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix and its processed product by OPLS-DA in Jiangyou, Sichuan Province

对四川绵阳产地 10 批炮制前后川乌进行 OPLS-DA 分析，共提取得到 9 个主成分 (VIP>1.0)，模型参数  $R^2X$  值、 $R^2Y$  值及  $Q^2$  值分别为 0.964、0.999、0.995，结果显示在得分散点图中炮制前后的川乌明显被分为 2 类，峰 2、22 (BAC)、1、7、19、3、21 (BMA)、17 (BHA)、10 的变化对四川绵阳产地炮制前后川乌的区分贡献较大，推测苯甲酰乌头原碱可能为四川绵阳产地川乌炮制前后的差异成分，该分析结果与 HCA 和 PCA 结果基本一致，见图 12。

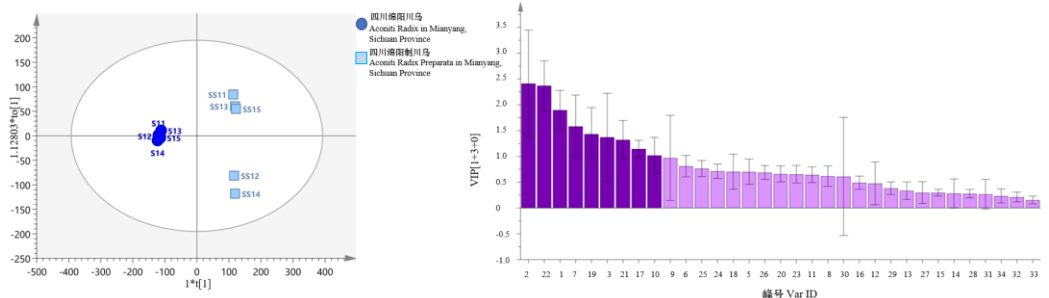


图 12 四川绵阳川乌炮制前后 OPLS-DA 得分图及 VIP 分析图

Fig.12 OPLS-DA score scatter plot and VIP analysis of Aconiti Radix and its processed product by OPLS-DA in Mianyang, Sichuan Province

综合上述化学计量学方法结果，分别对 3 个不同产地各 10 批川乌炮制前后的差异成分与所有产地 30 批川乌炮制前后的差异性成分进行筛选与比对：得出 4 个共有的差异成分，分别为峰 1、19、21 (Mes)和 22 (Hyp)，与文献(于永军等，2009)中报道的基本一致，被指认的新乌头碱和次乌头碱可能为川乌炮制前后潜在差异成分；川乌 3 个不同产地的 11 个主要潜在差异成分，分别为峰 11、13、19、20、21 (Mes)、23 (Aco)、24、27、31、32 和 34，结合文献(魏惠珍等，2020)，被指认的新乌头碱可能为不同产地川乌潜在差异成分；制川乌 3 个不同产地的 6 个主要潜在差异成分，分别为峰 5、16 (BMA)、17 (BAC)、18 (BHA)、25 和 29，被指认的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱可能为不同产地制川乌的潜在差异成分。

### 2.3 方法学考察结果

#### 2.3.1 线性关系考察

分别以质量浓度为横坐标(X)与峰面积为纵坐标(Y)，进行线性回归，得到 Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA 的线性回归方程分别为  $Y=1\,430\,998\,172X+203\,326.359$  ( $r=0.999\,0$ )、 $Y=14\,679\,346.961\,8X-37\,144.522\,8$  ( $r=0.999\,7$ )、 $Y=16\,104\,467.116\,6X-50\,882.606\,4$  ( $r=0.999\,7$ )、 $Y=16\,143\,894.811\,5X-271\,765.766\,7$  ( $r=0.999\,6$ )、 $Y=26\,224\,738.888\,2X-121\,965.41$  ( $r=0.999\,5$ )、 $Y=28\,537\,646.881\,8X-454\,764\,67$  ( $r=0.998\,7$ )，线性范围分别为 0.012 7~0.317 0、0.012 7~0.318 0、0.012 0~0.300 0、0.078 0~0.900 0、0.013 0~0.150 0、0.016 9~0.195 0  $\text{mg mL}^{-1}$ 。

#### 2.3.2 精密度考察

计算 Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA 峰面积的 RSD 分别为 1.69%、2.31%、2.02%、3.05%、2.98%、3.66% ( $n=5$ )，表明仪器精密度较好。

2.3.3 稳定性考察

计算 Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA 峰面积的 RSD 分别为 3.64%、2.92%、3.81%、2.58%、1.69%、3.99% ( $n=6$ )，表明该供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性考察

计算 Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA 峰面积的 RSD 分别为 3.75%、3.88%、3.08%、3.19%、2.96%、2.01% ( $n=5$ )，表明该方法重复性较好。

2.3.5 加样回收率考察

计算 Mes、Aco、Hyp、BMA、BAC、BHA 的平均加样回收率分别为 97.97%、98.65%、97.91%、98.20%、97.02%、100.01%，RSD 分别为 4.75%、4.08%、3.28%、3.99%、4.06%、2.91% ( $n=3$ )。

2.4 含量测定结果

30 批炮制前后的川乌含量测定结果见表 1 及表 2，本实验中制川乌样品的双酯型生物碱可能由于含量极低均未检出，故未列在表格中。由含量测定结果可知，3 个产地川乌中四川江油所产川乌的新乌头碱和乌头碱含量明显高于另外两个产地，其中新乌头碱含量最高，与文献(熊江等，2005)结果一致，另外两个产地川乌中的次乌头碱含量最高，这可能与四川江油的地理环境有关(林华和邓广海，2011；Luo et al., 2018；魏惠珍等，2020)；炮制后单酯型乌头碱含量均增加，双酯型乌头碱含量显著减少，与以往研究结果一致(于永军等，2009)，其中四川江油产川乌炮制后苯甲酰新乌头碱含量升高且明显高于另外两个产地，而另外两产地川乌炮制后苯甲酰次乌头碱含量升高的更显著，以上含测结果与化学计量学分析结果相互佐证。

表 1 川乌炮制前后的 30 批样品中单酯型生物碱含量测定结果(%， $n=3$ )

Table 1 Determination of monoester alkaloids in 30 batches of Aconiti Radix and its processed product (%， $n=3$ )

编号 No.	BMA	BAC	BHA	单酯型生物碱总量 Amounts of monoester alkaloids	编号 No.	BMA	BAC	BHA	单酯型生物碱总量 Amounts of monoester alkaloids
S1	0.044 7	0.004 9	0.006 1	0.055 7	SS1	0.062 3	0.005 9	0.017 7	0.086 0
S2	0.033 9	0.004 1	0.005 7	0.043 7	SS2	0.055 2	0.004 8	0.017 6	0.077 5
S3	0.032 7	0.004 5	0.005 8	0.043 1	SS3	0.060 4	0.005 8	0.017 4	0.083 7
S4	0.035 3	0.004 3	0.005 7	0.045 4	SS4	0.061 7	0.005 5	0.017 9	0.085 1
S5	0.035 6	0.004 5	0.005 6	0.045 8	SS5	0.060 0	0.004 6	0.016 0	0.080 6
S6	0.036 6	0.005 2	0.003 4	0.045 2	SS6	0.094 9	0.006 5	0.006 1	0.107 6
S7	0.038 5	0.005 1	0.003 5	0.047 2	SS7	0.094 5	0.006 5	0.006 1	0.107 1
S8	0.037 9	0.005 5	0.003 1	0.046 4	SS8	0.092 7	0.006 3	0.005 9	0.104 9
S9	0.044 2	0.004 9	0.003 3	0.052 4	SS9	0.097 7	0.006 4	0.006 3	0.110 4
S10	0.038 8	0.005 0	0.003 2	0.047 0	SS10	0.094 7	0.006 5	0.006 0	0.107 3
S11	0.040 7	0.005 1	0.005 7	0.051 5	SS11	0.071 5	0.006 8	0.016 0	0.094 3
S12	0.039 5	0.005 1	0.005 7	0.050 3	SS12	0.072 5	0.006 6	0.016 0	0.095 1
S13	0.039 2	0.005 5	0.005 8	0.050 4	SS13	0.071 7	0.006 7	0.016 1	0.094 5
S14	0.039 3	0.004 7	0.005 8	0.049 8	SS14	0.070 6	0.006 7	0.015 5	0.092 8
S15	0.039 0	0.005 5	0.005 2	0.049 7	SS15	0.069 1	0.006 9	0.015 5	0.091 4

表 2 生川乌 15 批样品中双酯型生物碱含量测定结果(% , n=3)

Table 2 Determination of diester alkaloids in 15 batches of Aconiti Radix samples (% , n=3)

编号 No.	Mes	Hyp	Aco	双酯型生物碱总量 Amounts of diester alkaloids	编号 No.	Mes	Hyp	Aco	双酯型生物碱总量 Amounts of diester alkaloids
S1	0.011 3	0.053 8	0.001 6	0.066 6	S9	0.061 8	0.020 5	0.007 8	0.090 2
S2	0.014 1	0.045 2	0.002 4	0.061 8	S10	0.067 3	0.022 3	0.008 7	0.098 3
S3	0.012 4	0.047 0	0.002 0	0.061 4	S11	0.017 1	0.042 9	0.005 6	0.065 6
S4	0.013 9	0.046 3	0.002 3	0.062 5	S12	0.019 0	0.047 0	0.006 5	0.072 4
S5	0.012 7	0.044 5	0.002 9	0.060 1	S13	0.017 7	0.044 4	0.006 5	0.068 6
S6	0.066 1	0.021 4	0.008 1	0.095 6	S14	0.016 0	0.040 8	0.005 5	0.062 4
S7	0.058 2	0.019 5	0.007 1	0.084 8	S15	0.021 8	0.049 9	0.006 6	0.078 3
S8	0.059 8	0.020 1	0.007 6	0.087 5					

3 讨论与结论

本实验分别选用无水乙醇、95%乙醇、异丙醇-乙酸乙酯(1:1)3种溶剂对供试品进行超声提取,结果表明,采用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)提取得到的供试品溶液,经 HPLC 检测所得的色谱峰较多且峰形较好;另外本课题组还考察了乙腈-四氢呋喃(25:15)-0.1 mol L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液(每 1000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)、乙腈-0.1 mol L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液、乙腈-冰醋酸(0.2%)水溶液(三乙胺调 pH 值 6.20)3个流动相系统,最终选择乙腈-冰醋酸(0.2%)水溶液(三乙胺调 pH 值 6.20)作为流动相系统,分离度及峰形均较好,且基线较平稳,有利于指纹图谱分析。

相似度分析结果显示四川省两个产地的川乌与制川乌相似度均高于陕西汉中;化学计量法分析结果显示新乌头碱和次乌头碱可能为川乌炮制前后潜在差异成分,结合文献(魏惠珍等, 2020)推测新乌头碱可能为不同产地川乌的潜在差异成分,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱可能为不同产地制川乌的潜在差异成分;含量测定结果显示 3个产地川乌中四川江油的新乌头碱含量最高,与文献(熊江等, 2005)结果一致,且明显高于另外两个产地,3个产地制川乌中四川江油的苯甲酰新乌头碱含量明显高于另外两个产地。结合上述结果分析,新乌头碱和苯甲酰新乌头碱可能分别为四川江油道地产川乌与制川乌的差异性成分,且本实验通过对比化学计量学结果发现,不同产地川乌及制川乌潜在差异成分不存在交集,并对比文献(于永军等, 2009)发现炮制前后化学成分差异较明显,因此川乌生品及炮制品应分别建立产地差异质量控制标准。

综上,建立川乌与制川乌的 HPLC 指纹图谱可较为全面的反映 3个产地川乌炮制前后的化学成分信息,结合化学计量学及主成分含量测定,使分析结果更科学、全面,可为完善川乌与制川乌的质量控制标准提供实验依据。

参考文献:

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China Version[M]. Beijing: Chin Med Sci Press:40-43. [国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社: 40-43.]

DENG GH, 2011. The study of processing technology and fingerprint of Aconiti Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese medicine. [邓广海, 2011. 川乌、草乌炮制工艺及指纹图谱的研究[D]. 广州: 广州中医药大学.]

HUANG ZF, YI JH, CHEN DA, et al., 2011. HPLC specific chromatogram of Radix Aconiti praeparata and determination of six esteric alkaloids[J]. Chin J Pharm Anal, 31(2): 217-221. [黄志芳, 易进海, 陈东安, 等, 2011. 制川乌 HPLC 特征图谱研究和 6 种酯型生物碱的含量测定[J]. 药物分析杂志, 31(2): 217-221.]

LI MT, XIE XF, CHEN HM, et al., 2020. Aconitine induces cardiotoxicity through regulation of

chinaXiv:202204.00013v1

- calcium signaling pathway in zebrafish embryos and in H9c2 cells[J]. J Appl Toxicol, 40(6):1-14.
- LIN H, DENG GH, 2011. HPLC fingerprint of Radix Aconiti[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 17(3):73-76. [林华, 邓广海, 2011. 川乌 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 17(3): 73-76.]
- LIU F, HAN X, LI N, et al., 2019. Aconitum alkaloids induce cardiotoxicity and apoptosis in embryonic zebrafish by influencing the expression of cardiovascular relative genes[J]. Toxicol Lett, 305(2):10-18.
- LIU S, LI F, LI Y, et al., 2017. A review of traditional and current methods used to potentially reduce toxicity of *Aconitum* roots in Traditional Chinese Medicine[J]. J Ethnopharmacol, 207:237-250.
- LUO H, HUANG ZF, TANG XL, et al., 2016. Dynamic variation patterns of aconitum alkaloids in daughter root of *Aconitum Carmichaelii* (Fuzi) in the decoction process based on the content changes of nine aconitum alkaloids by HPLC- MS- MS[J]. Iran J Pharm Res, 15(1):263-273.
- LUO CM, YI FL, XIA YL, et al., 2018. Comprehensive quality evaluation of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx. (Fuzi): simultaneous determination of nine alkaloids and chemical fingerprinting coupled with chemometric analysis[J]. J Sep Sci, 42(5): 980–990.
- MA LJ, CHEN QX, HAN L, et al., 2016. Study on HPCE-DAD fingerprint of aconitum and aconite[J]. Inner Mongol Tradit Chin Med, 2016, 35(15):5. [马丽娟, 陈巧霞, 韩乐, 等, 2016. 乌头附子类药材 HPCE-DAD 指纹图谱的研究[J]. 内蒙古中医药, 35(15): 5.]
- MIAO LL, ZHOU QM, PENG C, et al., 2019. Discrimination of the geographical origin of the lateral roots of *Aconitum carmichaelii* using the fingerprint, multicomponent quantification, and chemometric methods[J]. Molecules, 24(22): 4124.
- NYIRIMIGABO E, XU YY, LI YB, et al., 2015. A review on phytochemistry, pharmacology and toxicology studies of Aconitum[J]. J Pharm Pharmacol, 67(1):1-19.
- QIN Y, WANG JB, ZHAO YL, et al., 2012. Establishment of a bioassay for the toxicity evaluation and quality control of Aconitum herbs[J]. J Hazard Mat, 199-200(15): 350-357.
- QIN YX, 2016. Study on factors affecting quality and quality control in processing of Radix Aconiti[D]. Beijing: Beijing University of Chinese medicine. [秦语欣, 2016. 川乌炮制过程中影响质量的因素分析及质量控制研究[D]. 北京: 北京中医药大学.]
- SHAW D, 2010. Toxicological risks of Chinese herbs[J]. Planta Med, 76(17): 2012-2018.
- SI XX, 2019. Study on the quality evaluation and grade standard of Aconiti Radix[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. [司欣鑫, 2019. 川乌质量评价及等级标准研究[D]. 雅安: 四川农业大学.]
- TANG M, ZHAO LC, XU M, et al., 2017. Chemical constituents and pharmacological activities of Aconiti lateralis Radix Praeparata[J]. Guihaia, 37(12):1614-1627. [唐梅, 赵立春, 徐敏, 等, 2017. 附子化学成分和药理作用研究进展[J]. 广西植物, 37(12): 1614-1627.]
- WANG C, SUN DN, LIU CF, et al., 2015. Mother root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux exerts antinociceptive effect in Complet Freund's Adjuvant-induced mice: roles of dynorpin/kappa-opioid system and transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel[J]. J Transl Med, 13(1):284.
- WANG FP, CHEN QH, 2010. The C19-diterpenoid alkaloids[J]. The Alkaloids Chem Biol, 69:1-577.
- WEI HZ, YANG L, SONG XZ, et al., 2020. Study on quality marker of Aconiti Radix based on

- multivariate statistical analysis[J]. Chin Med Mat, 43(7):1658-1662. [魏惠珍, 杨磊, 宋细忠, 等, 2020. 基于多元统计分析的川乌质量标志物研究[J]. 中药材, 43(7): 1658-1662.]
- YANG L, 2020. Study of quality standard of Aconiti Radix -quality evaluation and grade standard research[D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese medicine. [杨磊, 2020. 川乌质量标准化研究-质量评价和等级标准研究[D]. 南昌: 江西中医药大学.]
- XIONG J, TAN NH, ZHOU J, 2005. Fingerprint and alkaloid content determination of Radix Aconiti[C]. Wuhan: Proceedings of the 8th National Symposium on traditional Chinese medicine and natural medicine and the 5th National Symposium on medicinal plants and plant pharmacy, 343. [熊江, 谭宁华, 周俊, 2005. 川乌的指纹图谱及生物碱含量测定[C]. 武汉: 第八届全国中药和天然药物学术研讨会与第五届全国药用植物和植物药学术研讨会论文集, 343.]
- YE XT, ZHONG LY, ZHANG DY, et al., 2020. Research progress on multi-material and multi-process processing of Aconiti Radix[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 26(18): 202-209. [叶协滔, 钟凌云, 张大永, 等, 2020. 川乌的多物料, 多流程炮制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 26(18): 202-209.]
- YU HH, LI M, LI YB, et al., 2019. Benzoylaconitine inhibits production of IL-6 and IL-8 via MAPK, Akt, NF- $\kappa$ B signaling in IL-1 $\beta$ -induced human synovial cells[J]. Biol Pharm Bull, 43(2):334-339.
- YU YJ, LI JS, CAI H, et al., 2009. The comparative study of HPLC fingerprint between Radix Aconiti and Radix Aconiti preparata[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 27(11):2456-2458. [于永军, 李俊松, 蔡皓, 等, 2009. 川乌炮制前后高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 中华中医药学刊, 27(11): 2456-2458.]
- ZHAO FC, NIE JH, WANG W, et al., 2014. HPLC fingerprint analysis of Aconitum Herbals in Xinjiang[J]. J Chin Pharm Sci, 49(24):2159-2164. [赵翡翠, 聂继红, 王伟, 等, 2014. 基于HPLC 指纹图谱的准噶尔乌头化学亲缘关系研究[J]. 中国药学杂志, 49(24): 2159-2164.]
- ZHAO JN, HUA H, DAI Y, et al., 2020. Dao-di herbs pharmacology and new ideas of Dao-di herbs standard construction[J]. Chin J Chin Mat Med, 45(4): 7-12. [赵军宁, 华桦, 戴瑛, 等, 2020. 道地药材药理学与道地药材标准构建新思路[J]. 中国中药杂志, 45(4): 7-12.]
- ZHENG QF, ZHAO YL, WANG JB, et al., 2014. Spectrum-effect relationships between UPLC fingerprints and bioactivities of crude secondary roots of *Aconitum carmichaelii* Debeaux (Fuzi) and its three processed products on mitochondrial growth coupled with canonical correlation analysis[J]. J Ethnopharmacol, 153(3):615-23.
- ZHU HB, WANG CY, QI Y, et al., 2013. Fingerprint analysis of Radix Aconiti using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/ tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MS n) combined with stoichiometry[J]. Talanta, 103: 56-65.